

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2003年12月11日 (11.12.2003)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 03/101491 A1(51) 国際特許分類: A61K 45/00, 31/517, 31/519,
31/5377, A61P 9/10, 17/06, 27/02, 35/00本社内 Tokyo (JP). 矢野 慎二 (YANO, Shinji) [JP/JP]; 〒
103-8405 東京都中央区日本橋本町二丁目2番6号
三菱ウェルファーマ株式会社 東京本社内 Tokyo (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP03/06988

(22) 国際出願日: 2003年6月3日 (03.06.2003)

(74) 代理人: 高島 一 (TAKASHIMA, Hajime); 〒541-0044
大阪府大阪市中央区伏見町四丁目2番14号 藤村
大和生命ビル Osaka (JP).

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願2002-162130 2002年6月3日 (03.06.2002) JP(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB,
BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK,
DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU,
ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT,
LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO,
NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL,
TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU,
ZA, ZM, ZW.(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 三菱
ウェルファーマ株式会社 (MITSUBISHI PHARMA
CORPORATION) [JP/JP]; 〒541-0046 大阪府大阪市
中央区平野町二丁目6番9号 Osaka (JP).(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ,
SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM,
AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許
(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB,
GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR),
OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW,
ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 鈴木 毅
(SUZUKI, Tsuyoshi) [JP/JP]; 〒103-8405 東京都中央区
日本橋本町二丁目2番6号 三菱ウェルファーマ株式
会社 東京本社内 Tokyo (JP). 北野 靖典 (KITANO, Ya-
sunori) [JP/JP]; 〒103-8405 東京都中央区日本橋本町
二丁目2番6号 三菱ウェルファーマ株式会社 東京添付公開書類:
— 国際調査報告書

[続葉有]

(54) Title: PREVENTIVES AND/OR REMEDIES FOR SUBJECTS WITH THE EXPRESSION OR ACTIVATION OF Her2
AND/OR EGFR

(54) 発明の名称: Her2又は／及びEGFR発現又は活性化対象に用いる予防又は／及び治療剤

レーン
LANE

1 2 3 4 5 6 7 8

上段
UPPER COLUMN下段
LOWER COLUMN(57) Abstract: Her2 and/or EGFR inhibitors to be administered to subjects with the overexpression or activation of Her2 and/or
EGFR that have been subjected to an examination for detecting the expression or activity of Her2 and/or EGFR and thus regarded
as having the overexpression or activation of Her and/or EGFR; and medicinal compositions containing such an inhibitor.(57) 要約: Her2又は／及びEGFR発現又は活性を検出するための検査により被検対象のHer2又は／及びEGFRの発現
又は活性を診断し、その結果、Her2又は／及びEGFRが過剰発現又は活性化していると判断された被検対象に対し
て投与するためのHer2又は／及びEGFR阻害剤、及び、かかる阻害剤を含有する医薬組成物。

WO 03/101491 A1

WO 03/101491 A1



2文字コード及び他の略語については、定期発行される
各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語
のガイダンスノート」を参照。

明 細 書

Her2又は/及びEGFR発現又は活性化対象に用いる予防又は/及び治療剤

技術分野

本発明は、被検対象に対してHer2又は/及びEGFRの発現又は活性化診断を行い、
5 それらの発現が確認された被検対象を治療の対象とする一連の治療方法に使用する
薬剤に関する。

背景技術

従来、抗癌剤の標的分子はDNAやRNAの合成に関与する分子そして細胞分裂に関与
する分子が主であった。これらの抗癌剤は、標的分子が癌細胞特異的ではないため
10 、骨髄毒性などの重篤な副作用を引き起こすことが知られている。

近年、分子腫瘍学の発展により癌の発生は癌遺伝子、癌抑制遺伝子の異常によっ
て引き起こされることが明らかになった。最もよく知られた癌遺伝子として上皮増
殖因子受容体 (epidermal growth factor receptor、以下EGFRと略す。) とその類縁
のhuman EGFR type2 (以下Her2と略す。別名erbB-2とも呼ぶ。) が挙げられる。

15 EGFRとHer2はそれぞれ分子量170kD、185kDの膜貫通型糖蛋白質である。EGFRとHer2
の細胞内ドメインにはチロシンキナーゼドメインが存在し、リン酸化反応を通して
信号を核へ伝えている。互いのキナーゼドメインのアミノ酸配列は約80%の相同性を
持ち構造的によく似ているが、C末端にある自己リン酸化ドメインの相同性は約30%
と低く両レセプターの信号伝達機構に質的違いがあることが推察される。

20 EGFRは食道癌に89%と極めて高い頻度で発現している[J. Cancer Res. Clin.
Oncol. 1993 119, 401-407]。一方、その他の癌種では非小細胞肺癌の45%にEGFRの
過剰発現[Cancer Res. 1993 53, 2379-2385]、グリオブラストーマの50%にEGFRの遺
伝子増幅[Cancer Res. 2000 60, 1383-1387]などの報告がある。

Her2に関しては乳癌の39%に遺伝子増幅[J. Clin. Oncol. 1993 11, 1936-1942]
25 、卵巣癌の32%に過剰発現[Cancer Res. 1990 50, 4087-4091]、ホルモン抵抗性前立
腺癌の67%に過剰発現[Clinical Cancer Res. 2001 7, 2643-2647]などの報告がある

。

5

10

15

20

25

同様にEGFRとHer2のデュアル阻害剤も研究開発されているがまだ実用化には至っていない。

抗Her2抗体ハーセプチンはHer2の発現診断ハーセプテスト（Herceptest：商品名）で治療対象患者の選別を既に行っているが、適応癌種は乳癌に限定されている。

- 5 EGFRキナーゼ阻害剤イレッサ（Iressa：商品名、A. Zeneca社）には従来の抗癌剤が持つ骨髄毒性などの重篤な副作用がないこと、そして、非小細胞肺癌に有効であることが臨床試験で示されてきた[Clin. Cancer Res. 2001 7, 3780s]。しかし、イレッサの臨床試験では治療対象患者の選択のためにEGFR発現を事前に確認する作業は行われていない。
- 10 EGFRとHer2のデュアル阻害剤は、いずれかの標的分子が発現している癌であれば適応範囲とする事ができるため、幅広い臓器癌を対象とする。しかし、既に記述したように、より正確には標的蛋白の発現又は活性化を診断することにより治療対象患者を適切に選別した上での処方が望ましく、デュアル阻害剤によるこの一連の治療法は医療現場において未だ確立されたものではない。
- 15 癌組織中の標的分子の発現と抗癌剤の感受性に関する別の例としては、乳癌組織中のチミジル酸合成酵素（Thymidylate synthase：TS）発現量及びジヒドロピリミジン脱水素酵素（Dihydropyrimidine dehydrogenase）活性値と5FU感受性は関連があるとの報告がある[日本癌治療学会誌 2000 35, 340]。しかし、実際に治療法として5FU処方前にTS発現診断を行うには至っていない。
- 20 上記のように、抗癌剤の処方にあたり、薬剤の標的分子を診断して効果的な治療法を予測することが切望されている。

発明の開示

- 本発明者らは、前述の事情に鑑み上記課題を解決すべく鋭意研究を進めた結果、被検対象に対してHer2又は／及びEGFRの発現又は活性診断を行い、それらの発現又は活性が確認された被検対象に対してHer2又は／及びEGFR阻害剤を投与することにより、一連の治療法を確立し得ることを見出すに至った。
- 25

すなわち、本発明は、このような一連の治療法において投与されるHer2又は／及

びEGFR阻害剤、該阻害剤を有効成分とする医薬組成物、該阻害剤を被検対象に投与することを特徴とする予防又は／及び治療方法関し、さらに詳細には以下のとおりである。

本発明は、

- 5 (1) Her2又は／及びEGFR発現又は活性を検出するための検査により被検対象のHer2又は／及びEGFR発現又は活性を診断し、その結果、Her2又は／及びEGFRが過剰発現又は活性化していると判断された被検対象に対して投与するためのHer2又は／及びEGFR阻害剤、
- 10 (2) Her2又は／及びEGFRの活性を検出するための検査により被検対象のHer2又は／及びEGFRの活性を診断し、その結果、Her2又は／及びEGFRが活性化していると判断された被検対象に対して投与するための前記(1)に記載の阻害剤。
- 15 (3) Her2及びEGFR発現又は活性を検出するための検査により被検対象のHer2及びEGFR発現又は活性を診断し、その結果、Her2及びEGFRが過剰発現又は活性化していると判断された被検対象に対して投与されるHer2及びEGFR阻害剤である前記(1)
- 20 (4) Her2及びEGFRの活性を検出するための検査により被検対象のHer2及びEGFRの活性を診断し、その結果、Her2及びEGFRが活性化していると判断された被検対象に対して投与するための前記(3)に記載の阻害剤。
- 25 (5) 被検対象が、Her2又は／及びEGFRの過剰発現又は活性化に起因する疾患を患っているとして予想されるものである前記(1)に記載の阻害剤、
- (6) 被検対象が、Her2及びEGFRの過剰発現又は活性化に起因する疾患を患っていると予想されるものである前記(3)に記載の阻害剤、
- (7) 被検対象がヒトである、前記(1)から(6)のいずれか1に記載の阻害剤、
- (8) Her2又は／及びEGFR発現又は活性を検出するための検査が体外検査である前記(1)に記載の阻害剤、
- (9) Her2及びEGFR発現又は活性を検出するための検査が体外検査である前記(3)

)に記載の阻害剤、

(10) Her2阻害剤及びEGFR阻害剤からなる合剤である前記(3)に記載の阻害剤

(11) Her2阻害剤及びEGFR阻害剤を同時に、別々に、又は経時的に間隔を置いて

5 投与するための前記(3)に記載の阻害剤、

(12) 体外検査が、抗体を用いた免疫学的方法又は核酸及び核酸誘導体を用いたハイブリダイゼーション法である前記(8)又は(9)に記載の阻害剤、

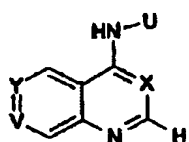
(13) 抗体を用いた免疫学的方法が、固相酵素免疫検定法、酵素-結合免疫アッセイ法、ラジオイムノアッセイ法、免疫組織化学的方法、及びウエスタンブロット

10 法からなる群より選ばれる方法である前記(12)に記載の阻害剤、

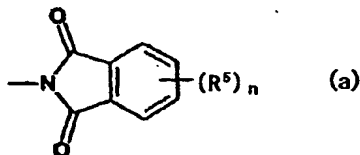
(14) 核酸及び核酸誘導体を用いたハイブリダイゼーション法が、RT-PCR法、ISH法、FISH法、ノーザンブロット法、及びサザンブロット法からなる群より選ばれる方法である前記(12)に記載の阻害剤、

(15) 下記一般式(I)

15



(I)



(a)

{式中、XはN又はCHであり；YがCR¹であって、VがNであるか；又はYがNであって、VがCR¹であるか；又はYがCR¹であって、VがCR²であるか；又はYがCR²であって、VがCR¹であり；R¹はC₁₋₄アルキル、C₁₋₄アルコキシ、CH₃SO₂CH₂CH₂NHCH₂-Ar-（ここで、Arはフェニル、フラン、チオフェン、ピロール及びチアゾールから選択され、その各々は所望により1もしくは2個のハロゲン、C₁₋₄アルキル又はC₁₋₄アルコキシで置換されていてもよい。）又は-C≡C-C(R⁶)(R⁷)(R⁸)（ここで、R⁶、R⁷、R⁸はそれぞ

20

- れ独立して、水素原子、ヒドロキシ、ハロゲン、 C_{1-4} アルキル又は C_{1-4} アルコキシ、又は、環が水素原子又は C_{1-4} アルキルで置換されていてもよく、環内にO、S又はNから選ばれる1から2個のヘテロ原子を含んでいてもよい C_{3-6} のシクロアルキルを表す。)を表し; R^2 は水素、ハロゲン、ヒドロキシ、 C_{1-4} アルキル、 C_{1-4} アルコキシ、 C_{1-4} アルキルアミノ、ジ[C_{1-4} アルキル]アミノ及びN-HCO- R^9 (ここで、 R^9 は C_{1-4} アルキル、 C_{1-4} アルコキシ、 C_{2-4} アルケニル又は C_{2-4} アルキニルを示す。)からなる群から選択され; U は R^3 基で置換され、かつさらに所望により独立に選択される少なくとも1個の R^4 基で置換されていてもよいフェニル、ピリジル、3H-イミダゾリル、インドリル、イソインドリル、インドリニル、イソインドリニル、1H-インダゾリル、2,3-ジヒドロ-1H-インダゾリル、1H-ベンズイミダゾリル、2,3-ジヒドロ-1H-ベンズイミダゾリル又は1H-ベンゾトリアゾリル基を表し; R^3 はベンジル、ハロー、ジハロー及びトリハロベンジル、ベンゾイル、ピリジルメチル、ピリジルメトキシ、フェノキシ、ベンジルオキシ、ハロー、ジハロー及びトリハロベンジルオキシならびにベンゼンスルホニルからなる群から選択されるか;又は R^3 はトリハロメチルベンジル又はトリハロメチルベンジルオキシを表すか;又は R^3 は上記式(a)の基を表し(式中、 R^5 は各々独立にハロゲン、 C_{1-4} アルキル及び C_{1-4} アルコキシから選択され;かつ、 n は0~3である); R^4 は各々独立にヒドロキシ、ハロゲン、 C_{1-4} アルキル、 C_{2-4} アルケニル、 C_{2-4} アルキニル、 C_{1-4} アルコキシ、アミノ、 C_{1-4} アルキルアミノ、ジ[C_{1-4} アルキル]アミノ、 C_{1-4} アルキルチオ、 C_{1-4} アルキルスルフィニル、 C_{1-4} アルキルスルホニル、 C_{1-4} アルキルカルボニル、カルボキシ、カルバモイル、 C_{1-4} アルコキシカルボニル、 C_{1-4} アルカノイルアミノ、N-(C_{1-4} アルキル)カルバモイル、N、N-ジ(C_{1-4} アルキル)カルバモイル、シアノ、ニトロ及びトリフルオロメチルである。)で示される置換ヘテロ芳香族化合物、もしくはその薬学的に許容される塩、それらの水和物もしくは溶媒和物、それらの光学活性体もしくはラセミ体、又は、それらのジアステレオマー混合物である前記(1)又はから(14)のいずれか1に記載の阻害剤、

- (16) (4-(3-フルオロベンジルオキシ)-フェニル)-(6-(5-((2-メタンスルホニル-エチルアミノ)メチル)-フラン-2-イル)-ピリド[3, 4-d]ピリミジン-4-イル)-アミン;
- (4-ベンジルオキシフェニル)-(6-(5-((2-メタンスルホニル-エチルアミノ)-メチル)-フラン-2-イル)-キナゾリン-4-イル)-アミン;
- 5 N-{4-[(3-フルオロベンジル)オキシ]フェニル}-6-[5-([2-(メチルスルホニル)エチル]アミノ)メチル]-2-フリル]-4-キナゾリンアミン;
- N-[4-(ベンジルオキシ)フェニル]-7-メトキシ-6-[5-([2-(メチルスルホニル)エチル]アミノ)メチル]-2-フリル]-4-キナゾリンア
- 10 ミン;
- N-(1-ベンジル-1H-インダゾール-5-イル)-7-メトキシ-6-[5-([2-(メチルスルホニル)エチル]アミノ)メチル]-2-フリル]-4-キナゾリンアミン;
- 15 N-{3-フルオロ-4-[(3-フルオロベンジル)オキシ]フェニル}-6-[5-([2-(メチルスルホニル)エチル]アミノ)メチル]-2-フリル]-4-キナゾリンアミン;
- N-[1-(3-フルオロベンジル)-1H-インダゾール-5-イル]-6-[2-([2-(メチルスルホニル)エチル]アミノ)メチル]-1,3-チアゾール-4-イル]-4-キナゾリンアミン;
- 20 6-[5-([2-(メチルスルホニル)エチル]アミノ)メチル]-2-フリル]-N-[4-(フェニルスルホニル)フェニル]-4-キナゾリンアミン;
- N-{3-フルオロ-4-[(3-フルオロベンジル)オキシ]フェニル}-6-[2-([2-(メチルスルホニル)エチル]アミノ)メチル]-1,3-チアゾール-4-イル]-4-キナゾリンアミン;
- 25 N-(1-ベンジル-1H-インダゾール-5-イル)-6-[2-([2-(メチルスルホニル)エチル]アミノ)メチル]-1,3-チアゾール-4-イル]-

4-キナゾリンアミン；

N-(3-フルオロ-4-ベンジルオキシフェニル)-6-[5-([2-(メチルスルホニル)エチル]アミノ)メチル]-4-フリル]-4-キナゾリンアミン；

- 5 N-(3-クロロ-4-ベンジルオキシフェニル)-6-[2-([2-(メチルスルホニル)エチル]アミノ)メチル]-4-フリル]-4-キナゾリンアミン；
N-{3-クロロ-4-[(3-フルオロベンジル)オキシ]フェニル}-6-[5-([2-(メチルスルホニル)エチル]アミノ)メチル]-2-フリル]-4-キナゾリンアミン；

- 10 N-(1-ベンジル-1H-インダゾール-5-イル)-7-フルオロ-6-[5-([2-(メチルスルホニル)エチル]アミノ)メチル]-2-フリル]-4-キナゾリンアミン；

N-(3-トリフルオロメチル-4-ベンジルオキシフェニル)-6-[5-([2-(メチルスルホニル)エチル]アミノ)メチル]-4-フリル]-4-キナゾリンアミン；

- 15 N-[4-(3-クロロ-4-フルオロフェニル)アミノ]-7-[3-(4-モルホリニル)プロポキシ]キナゾリン-6-イル]アクリルアミド；

N-{4-[(3-クロロ-4-フルオロフェニル)アミノ]}-7-[3-メチル-3-(4-メチル-1-ピペラジニル)-1-ブチニル]-6-キナゾリニル}ア

- 20 クリルアミド；又は

N-{3-クロロ-4-[(3-フルオロベンジル)オキシ]フェニル}-6-[5-([2-(メタンスルホニル)エチル]アミノ)メチル]-2-フリル]-4-キナゾリンアミンもしくはその薬学的に許容される塩、それらの水和物もしくは溶媒和物、それらの光学活性体もしくはラセミ体、又は、それらのジアステレオマー混

- 25 合物である前記(1)から(15)のいずれか1に記載の阻害剤、

(17) N-[4-(3-クロロ-4-フルオロフェニル)アミノ]-7-[3-(4-モルホリニル)プロポキシ]キナゾリン-6-イル]アクリルアミド、又は

N-(3-クロロ-4-[(3-フルオロベンジル) オキシ] フェニル)-6-[5-
([2-(メタンスルホニル) エチル] アミノ) メチル]-2-フリル]-4-キ
ナゾリンアミンもしくはその薬学的に許容される塩、それらの水和物もしくは溶媒
和物、それらの光学活性体もしくはラセミ体又はそれらのジアステレオマー混合物

5 である前記(1)から(16)のいずれか1に記載の阻害剤、

(18) 前記(1)から(17)のいずれか1に記載の阻害剤を有効成分として含
有し、かつ製薬上許容され得る担体を含有する医薬組成物、

(19) Her2又は/及びEGFRの過剰発現又は活性化に起因する疾患の予防又は/及
び治療薬である前記(18)に記載の医薬組成物、

10 (20) Her2又は/及びEGFRの過剰発現又は活性化に起因する疾患が癌、癌及び肉
腫の成長に伴う血管新生、癌転移に伴う血管新生、糖尿病性網膜症に伴う血管新生
、動脈硬化、又は乾癬である前記(19)に記載の医薬組成物、

(21) Her2又は/及びEGFR発現又は活性を検出するための検査により被検対象の
Her2又は/及びEGFR発現又は活性を診断し、その結果、Her2又は/及びEGFRが過剰
15 発現又は活性化していると判断された被検対象に対して投与するための、Her2又は
/及びEGFRの過剰発現又は活性化に起因する疾患の予防又は/及び治療薬、

(22) Her2又は/及びEGFRの過剰発現又は活性化に起因する疾患が癌、癌及び肉
腫の成長に伴う血管新生、癌転移に伴う血管新生、糖尿病性網膜症に伴う血管新生
、動脈硬化、又は乾癬である前記(21)に記載の予防又は/及び治療薬、

20 (23) Her2又は/及びEGFR発現又は活性を検出するための検査により被検対象の
Her2又は/及びEGFR発現又は活性を診断し、その結果、Her2又は/及びEGFRが過剰
発現又は活性化していると判断された被検対象に対して有効量のHer2又は/及び
EGFR阻害剤を投与することを特徴とする、Her2又は/及びEGFRの過剰発現又は活性
化に起因する疾患の予防又は/及び治療方法、

25 (24) Her2又は/及びEGFRの過剰発現又は活性化に起因する疾患が癌、癌及び肉
腫の成長に伴う血管新生、癌転移に伴う血管新生、糖尿病性網膜症に伴う血管新生
、動脈硬化、又は乾癬である前記(23)に記載の予防又は/及び治療方法、

(25) 前記(18)から(20)のいずれか1に記載の医薬組成物、及び該医薬組成物をHer2又は/及びEGFRの過剰発現又は活性化に起因する疾患の予防又は/及び治療に使用し得るか又は使用すべきであることを記載した書類とを含む商業的パッケージ、

- 5 (26) Her2又は/及びEGFRの過剰発現又は活性化に起因する疾患が癌、癌及び肉腫の成長に伴う血管新生、癌転移に伴う血管新生、糖尿病性網膜症に伴う血管新生、動脈硬化、又は乾癬である前記(25)に記載の商業的パッケージ、に関する。

本発明における各定義は次の通りである。

- 「Her2又は/及びEGFR発現を検出するための検査」としては、Her2又は/及びEGFR
10 に対する抗体を用いた免疫学的方法、又は、核酸及び核酸誘導体を用いたハイブリダイゼーション法が挙げられ、免疫学的方法のより好ましい具体例としては、固相酵素免疫検定法、酵素-結合免疫アッセイ法、ラジオイムノアッセイ法、免疫組織化学的方法、又はウエスタンブロット法等が挙げられ、ハイブリダイゼーション法のより好ましい具体例としては、RT-PCR法、ISH法、FISH法、ノーザンブロット法、
15 又はサザンブロット法等が挙げられる。

- 「固相酵素免疫検定法 (ELISA=enzyme-linked immuno solvent assay)」とは、固相で行う酵素-結合免疫アッセイ法 (EIA) であり、抗原または抗体に共有結合で酵素を標識し、抗体または抗原の存在を、酵素活性を利用して検出する酵素-結合免疫アッセイ法を固相で行なう方法である。この方法は1971年 E. Engvalらによって
20 開発されたラジオイムノアッセイ (放射性免疫測定法:RIA) の抗原、抗体のいずれかに標識する放射性同位体を非放射性の酵素に置き換えたもので、1990年にzeptomole (zeptomole: 10^{-21} モル) レベルの抗原の測定も可能な方法として開発された。

- ELISA法には直接抗体法、間接抗体法、競合法、二抗体サンドイッチ法などがあり、測定目的にあった方法が選択される。固相にはアガロース、マイクロタイターウェル、ラテックス粒子などが利用され、標識酵素には、西洋ワサビ由来のペルオキシダーゼが最もよく利用される。その他の酵素としては、アルカリホスファターゼ、
25 ガラクトシダーゼ等も使われる。

なお、本発明においては、免疫組織化学的方法も適用可能である。

「ウエスタンブロット法」とは、PVDF膜などのメンブランに転写された蛋白質を抗体をつかって検出する方法である。抗体と抗原の特異的結合を利用するためサンプルは微量で済み、特異的にターゲットとする蛋白質を検出できる。

- 5 「ハイブリダイゼーション」とは、相補核酸鎖の相互作用を意味する。DNAは相補的相互作用（CはG、AはTと常に結合）による二本鎖構造をとっているため、相補鎖を分離するとお互いに好んでリアニール、すなわち“ハイブリダイズ”する。これは2本のDNA鎖や、塩基配列が十分に相補的なDNA鎖とRNA鎖の間でも生じる。ハイブリダイゼーションは、複製や転写など全てのDNAの生理的反応において生じ、サザン
- 10 プロッティングやノーザンブロッティング、PCR等多くの分子生物学的手法の基礎をなす。

- 「PCR (Polymerase Chain Reaction)」とは、DNA Polymeraseの反応を連続的、連鎖的に実行することにより、1セットのprimerの間にはさまれるDNA断片を特異的に増幅する反応である。中でも、逆転写反応とPCRを組み合わせた「RT-PCR (reverse
- 15 transcription-polymerase chain reaction) 法」はもっとも感度が高い。

「ISH (in situ ハイブリダイゼーション) 法」は組織断片での遺伝子発現の検出法として有効な手段である。本法と蛍光検出法とを組み合わせたものがFISH法である。

- 「ノーザンブロット法」とは、mRNAの解析を目的とした技術である。2次構造を
- 20 とりやすいRNAを変成条件下で電気泳動し、メンブラン（ナイロンやニトロセルロース等）にトランスファーする。変成方法によって1.ホルムアミドとホルムアルデヒドを用いる方法、2. グリオキサールを用いる方法、又は3. 水酸化メチル水銀を用いる方法等がある。

- 「サザンブロット法」とは、1975年にSouthernによって記載された転写の手法で
- 25 あり、標識された核酸プローブと相補的な塩基配列を持つ、転写されたDNAの領域を検出するものである。

Her2又は/及びEGFRの発現又は活性を検出するには、患者から採取した組織（癌

組織、血管壁組織、皮膚、口腔粘膜等）あるいは体液（血液、リンパ液）などを上記で挙げたような検査方法に付してHer2又は／及びEGFRの発現又は活性を検出する。

- 「Her2又は／及びEGFRの過剰発現又は活性化に起因する疾患」の具体例としては
- 5 、脳腫瘍、咽頭癌、喉頭癌、舌癌、食道癌、胃癌、大腸癌、非小細胞肺癌、膀胱癌、胆管癌、胆嚢癌、肝癌、腎癌、膀胱癌、前立腺癌、乳癌、卵巣癌、子宮頸癌、子宮体癌、皮膚癌、小児固形癌、骨腫瘍、血管腫等の癌、糖尿病性網膜症に伴う血管新生、動脈硬化、乾癬等が挙げられ、脳腫瘍、咽頭癌、喉頭癌、舌癌、食道癌、胃癌、大腸癌、非小細胞肺癌、膀胱癌、胆管癌、胆嚢癌、肝癌、腎癌、膀胱癌、前立腺癌
- 10 、乳癌、卵巣癌、子宮頸癌、子宮体癌、皮膚癌等が好ましく、脳腫瘍、胃癌、大腸癌、非小細胞肺癌、膀胱癌、腎癌、前立腺癌、乳癌、卵巣癌等がより好ましい。

「Her2又は／及びEGFRの過剰発現又は活性化」とは、生体の恒常性（ホメオスタシス）にとって必要な発現量又は活性以上の発現又は活性であり、同一起源の正常組織にとって必要な発現量又は活性以上の発現又は活性である。

- 15 「Her2又は／及びEGFRが過剰発現又は活性化している患者」とは、Her2又はEGFRの少なくとも一方が過剰発現又は活性化している患者、好ましくは両方が過剰発現又は活性化している患者である。本発明のHer2又は／及びEGFR阻害剤は、上記のようなHer2又は／及びEGFRが過剰発現又は活性化している患者の治療のために投与することを特徴とする。
- 20 本発明の「Her2又は／及びEGFR阻害剤」としては、Her2及びEGFRが過剰発現又は活性化している患者に対して投与するHer2及びEGFR阻害剤であることが好ましく、Her2阻害剤及びEGFR阻害剤からなる合剤であっても良く、Her2阻害剤及びEGFR阻害剤を同時に、別々に、又は、経時的に間隔を置いて使用することも可能である。即ち、Her2阻害剤とEGFR阻害剤とを種々異なるルートにより同時に、別々に、あるい
- 25 は、例えば同じ日に時間をずらして投与したり、数日から数週間又は数ヶ月にわたり、所定間隔で投与することも可能である。

本発明において使用するHer2阻害剤としては、抗Her2抗体ハーセプチン（Roche）

、TAK-165 (武田)、ETH-102 (ExonHit Ther.) 等が挙げられ、また、本発明において使用するEGFR阻害剤としては、イレッサ(A. Zeneca)、OSI-774 (Roche)、PKI-166 (Novartis)、EKB-569 (Wyeth) 等が挙げられる。これらの製造等に関しては、TAK-165 についてはWO02/06249号公報、特開2001-348385号公報、特開2002-69070号公報、
 5 特開平9-136877号公報、特開平11-60571号公報等に、イレッサについてはWO 96/33980号公報、特許第3040486号公報に、OSI-774についてはWO96/30347号公報 に、PKI-166についてはWO97/02266号公報に、EKB-569については米国特許第 6,002,008号に記載されている。

これらをHer2阻害剤及びEGFR阻害剤からなる合剤とする場合、それぞれの阻害剤
 10 から、1つ又は複数ずつを選択し適宜公知の方法により合剤を製造して使用することが出来る。

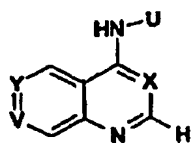
図面の簡単な説明

図1は、実施例4の化学発光をルミノCCDカメラで撮影した図である。

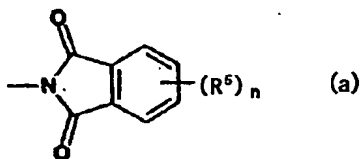
発明を実施するための最良の形態

15 本発明の阻害剤としては、デュアル阻害剤が好ましく、具体例としては、当該酵素の蛋白質キナーゼ活性の阻害に基づき作用する阻害剤、当該Her2又は／及びEGFRの細胞内蛋白質含量を減少させることにより作用する阻害剤、又は当該Her2又は／及びEGFRと信号伝達分子との物理的結合の阻害剤等が挙げられる。

「デュアル阻害剤」のより具体的な化合物の例としては、WO99/35146
 20 号公報(特表2002-500225号公報)に開示されている下記一般式(I)



(I)



(a)

{式中、XはN又はCHであり；YがCR¹であって、VがNであるか；又はYが

- Nであって、VがCR¹であるか；又はYがCR¹であって、VがCR²であるか；又はYがCR²であって、VがCR¹であり；R¹はCH₃SO₂CH₂CH₂NHCH₂-Ar-基（ここで、Arはフェニル、フラン、チオフェン、ピロール及びチアゾールから選択され、その各々は所望により1もしくは2個のハロゲン、C₁₋₄アルキル又はC₁₋₄アルコキシ基で置換されていてもよい）を表し；R²は水素、ハロゲン、ヒドロキシ、C₁₋₄アルキル、C₁₋₄アルコキシ、C₁₋₄アルキルアミノ及びジ[C₁₋₄アルキル]アミノからなる群から選択され；UはR³基で置換され、かつさらに所望により独立に選択される少なくとも1個のR⁴基で置換されていてもよいフェニル、ピリジル、3H-イミダゾリル、インドリル、イソインドリル、インドリニル、イソインドリニル、1H-インダゾリル、2, 3-ジヒドロ-1H-インダゾリル、1H-ベンズイミダゾリル、2, 3-ジヒドロ-1H-ベンズイミダゾリル又は1H-ベンゾトリアゾリル基を表し；R³はベンジル、ハロー、ジハロー及びトリハロベンジル、ベンゾイル、ピリジルメチル、ピリジルメトキシ、フェノキシ、ベンジルオキシ、ハロー、ジハロー及びトリハロベンジルオキシならびにベンゼンスルホニルからなる群から選択されるか；又はR³はトリハロメチルベンジル又はトリハロメチルベンジルオキシを表すか；又はR³は上記式(a)の基を表し（式中、R⁵は各々独立にハロゲン、C₁₋₄アルキル及びC₁₋₄アルコキシから選択され；かつ、nは0~3である）；R⁴は各々独立にヒドロキシ、ハロゲン、C₁₋₄アルキル、C₂₋₄アルケニル、C₂₋₄アルキニル、C₁₋₄アルコキシ、アミノ、C₁₋₄アルキルアミノ、ジ[C₁₋₄アルキル]アミノ、C₁₋₄アルキルチオ、C₁₋₄アルキルスルフィニル、C₁₋₄アルキルスルホニル、C₁₋₄アルキルカルボニル、カルボキシ、カルバモイル、C₁₋₄アルコキシカルボニル、C₁₋₄アルカノイルアミノ、N-(C₁₋₄アルキル)カルバモイル、N, N-ジ(C₁₋₄アルキル)カルバモイル、シアノ、ニトロ及びトリフルオロメチルである。}で示される置換ヘテロ芳香族化合物、特に好ましくは、N-(3-クロロ-4-[(3-フルオロベンジル)オキシ]フェニル)-6-[5-([2-(メタンスルホニル)エチル]アミノ)メチル]-2-フリル]-4-キナゾリンアミン等が、又はWO 00/31048

号公報に開示されているN-〔4-（3-クロロ-4-フルオロフェニル）アミノ〕-7-〔3-（4-モルホリニル）プロポキシ〕キナゾリン-6-イル〕アクリルアミド等が挙げられる。

- 一般式（I）の化合物は、薬学的に許容される塩、水和物もしくは溶媒和物、幾何異性体、光学異性体もしくはラセミ体、又はジアステレオマー混合物のいずれの形態であってもよい。薬学的に許容される塩としては、塩酸、臭化水素酸、リン酸、メタリン酸、硝酸および硫酸などの無機酸塩、ギ酸、酢酸、酒石酸、トリフルオロ酢酸、クエン酸、リンゴ酸、乳酸、フマル酸、マレイン酸、安息香酸、フタル酸、グリコール酸、グルクロン酸、グルコン酸、コハク酸、メタンスルホン酸、p-トルエンスルホン酸、イセチオン酸などの有機酸塩、ナトリウム、カリウム、マグネシウム、カルシウムなどのアルカリ金属・アルカリ土類金属塩、アンモニウム、テトラメチルアミン、トリエチルアミン、ベンジルアミン、フェネチルアミン、モノエタノールアミン、ジエタノールアミン、トリス（ヒドロキシエチルアミン）などの有機塩基塩、リジン、アルギニン、アスパラギン酸、グルタミン酸などのアミノ酸塩が挙げられる。

- 一般式（I）の化合物の製造方法及びデュアル阻害作用についてはWO 99/35146号公報に、N-〔4-（3-クロロ-4-フルオロフェニル）アミノ-7-〔3-（4-モルホリニル）プロポキシ〕キナゾリン-6-イル〕アクリルアミドの製造方法及びデュアル阻害作用についてはWO 00/31048号公報に記載されている。

本発明に係るデュアル阻害薬には上記した全ての化合物の他に、デュアル阻害作用を有するその他の化合物（例えば、WO 02/066451に記載されている化合物）が含まれる。

- 本発明の阻害剤を医薬として用いる場合、本発明の阻害剤を製薬上許容しうる担体（賦形剤、結合剤、崩壊剤、矯味剤、矯臭剤、乳化剤、希釈剤、溶解補助剤等）と混合して得られる医薬組成物あるいは製剤（錠剤、ピル剤、カプセル剤、顆粒剤、散剤、シロップ剤、エマルジョン剤、エリキシル剤、懸濁剤、溶液剤、注射剤、

点滴剤あるいは坐剤等)の形態で経口的又は非経口的に投与することができる。

本発明において、非経口とは、皮下注射、静脈内注射、筋肉内注射、腹腔内注射あるいは点滴法等を含むものである。

経口投与用の固形投与剤型としては、散剤、顆粒剤、錠剤、ピル剤、カプセル剤
5 等の上記したものがあげられる。そのような剤型において、活性成分化合物は薬学上許容され得る少なくとも一つの添加物(不活性希釈剤、滑沢剤、保存剤、抗酸化剤、崩壊剤、結合剤、増粘剤、緩衝剤、甘味付与剤、フレーバー付与剤、パーフェューム剤等)を含むことができる。

経口投与用の液剤は、医薬として許容されるエマルジョン剤、シロップ剤、エリ
10 キシル剤、懸濁剤、溶液剤等が挙げられ、それらは当該分野で普通に用いられる不活性希釈剤を含んでいてもよい。

注射用調剤(無菌注射用水性懸濁物あるいは油性懸濁物等)は、適当な分散化剤又は湿化剤及び懸濁化剤等を用いて当該分野で知られた方法で調製することができる。その無菌注射用調剤は、また、希釈剤あるいは溶剤を用いた無菌の注射のでき
15 る溶液または懸濁液であってもよい。さらに、通常溶剤又は懸濁化溶媒として無菌の不揮発性油も用いることができる。このためには、いかなる不揮発性油も脂肪酸も使用できる。

直腸投与用の坐剤は、その薬物と適当な非刺激性の補形剤、例えば常温では固体であるが、腸管の温度では液体で、直腸内で融解し、薬物を放出するもの等と混合
20 して製造することができる。

投与量は、年齢、体重、一般的健康状態、性別、食事、投与時間、投与方法、排泄速度、薬物の組合せ、治療を行っている患者のそのときの病状の程度に応じ、それらあるいはその他の要因を考慮して決められる。例えば上記一般式(I)で表される化合物を使用する場合、その1日の投与量は、患者の状態や体重、化合物の種類
25 、投与経路等によって異なるが、経口的には $0.01 \sim 1000 \text{ mg/kg 体重/日}$ 、好ましくは $0.05 \sim 500 \text{ mg/kg 体重/日}$ を、一日1～数回に分けて投与する。また、非経口的には、皮下、静脈内、筋肉内又は直腸内に、約 $0.01 \sim 50$

mg/kg体重/日、好ましくは0.01～20mg/kg体重/日投与するのが好ましい。

- 本発明のHer2又は/及びEGFRの発現又は活性化した患者に用いる予防又は/及び治療剤は、Her2又は/及びEGFRの発現又は活性を検査し、Her2又は/及びEGFRが過剰発現又は活性化していると判断された場合には、Her2又は/及びEGFRの発現又は活性化に起因する疾患を患っていると判定し、当該患者に使用し得るか若しくは使用すべきであることを記載した書類とともにパッケージすることによって、好適に医薬品として提供される。

(実施例)

- 以下、本発明について実施例を挙げて詳細に説明するが、その要旨を超えない限り、本発明は以下に限定されるものではない。

実施例 1

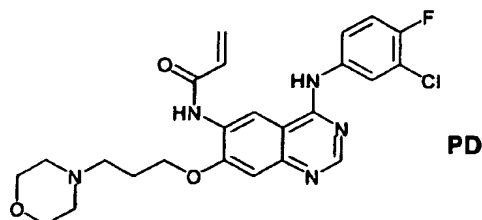
EGFRチロシンキナーゼ阻害作用

(方法)

- 試験に用いた薬剤PD 0183805は、EGFRチロシンキナーゼを阻害しEGFR過剰発現癌A431に対してin vivo制癌効果を示すことが知られている¹⁾。また、PD 0183805の2塩酸塩CI-1033はMDA-MB-453細胞をハーレギュリン刺激した時のHer2、erbB3そしてerbB4のチロシンリン酸化を阻害することが報告されている²⁾。

- 以下の記載においてPD 0183805をPD、PD 0183805の2塩酸塩CI-1033をPD・2HClと略す。PDの化学名及び化学構造は下記のとおりである。

N-[4-(3-クロロ-4-フルオロフェニル)アミノ-7-[3-(4-モルホリニル)プロポキシ]キナゾリン-6-イル]アクリルアミド



また、PD及びPD・2HClの合成は、WO 00/31048号公報に記載された方法に準じて行なった。

1) Vincent, P.W., Patmore, S.J., Bridges, A.J., Kirkish, L.S., Dudeck, R.C., Leopold, W.R., Zhou, H., Elliott, W.L. Proc. Am. Assoc. Cancer Res., 40: 117,
5 1999.

2) Slichenmyer, W.J., Elliott, W.L. and Fry, D.W. Semin. Oncol., 28: 80, 2001.

ヒト類表皮癌細胞A431（東北大学加齢医学研究所 医用細胞資源センターより供与；カタログ番号TKG-0182、またはATCCより購入の場合；ATCC番号CRL-1555）より
10 得られた部分的に精製されたEGFRを用い、Linda J. Pikeらのチロシンキナーゼ活性測定方法（Proceedings of the National Academy of Science of the U. S. A., 1982, 79, 1433）を改良して行なった。詳しい方法は以下の通りである。

A431細胞を10%FBS添加DMEM培地中で37℃、5%炭酸ガス下で培養し、この細胞を10 mM HEPES緩衝液(pH7.4)、0.25 M サッカロース、0.1 mM EDTAを含む溶液中で
15 ホモジネート後、3,000×Gで5分間遠心分離し、更にその上清を100,000×Gで30分間遠心分離を行いA431細胞膜画分を得、これを酵素源である部分精製EGFRとして測定に供した。

A431細胞膜画分（10～15 μg）、30 mM HEPES緩衝液（pH7.4）、2 mM MnCl₂、100 μM Na₃VO₄、及びジメチルスルホキシド(DMSO)に溶解した薬剤の反応混液（
20 終濃度 1% DMSO）に、100 ngのEGFを加えた後、合成基質アンジオテンシンII（Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe）50 μg、アデノシン三リン酸（γ-³²P-標識体37 KBqを含む）最終濃度10 μMを加えて反応を開始した。この時の容量は60 μLである。

反応は氷中にて30分間行い、10 mg/mL牛血清アルブミンを6 μLと20
25 %トリクロロ酢酸25 μL加えて反応を停止し、そのまま氷中に30分間放置した。

その後5000Gで2分間遠心した後、上清を40 μLサンプリングしてP81

ホスホセルロースペーパーに吸着させた。これを0.75%リン酸水に5分間浸して洗浄する操作を4回繰り返した後ペーパーを取り出し、液体シンチレーションカウンタで ^{32}P のカウントを測定し、この値をAとした。

同時に薬剤を添加しない反応、薬剤およびEGF共に添加しない反応のカウントも測定し、それぞれB、Cとした。

これらの値から、チロシンキナーゼ阻害率は、下記の式により求められる。

$$\text{阻害率(\%)} = 100 - \{(A - C) / (B - C)\} \times 100$$

薬剤の添加濃度を変化させて得られた阻害率より IC_{50} 値(50%阻害濃度)を算出した。結果を下記表に示す。

10 (表1)

EGFRチロシンキナーゼ阻害作用	
薬剤	IC_{50} nM
PD	0.4

実施例2

細胞H e r 2チロシンキナーゼ阻害作用

(方法)

細胞は659番目のバリンをグルタミン酸に置換することにより恒常的に活性化
 15 した変異c-erbB2で形質転換したNIH3T3マウス繊維芽細胞株(東北大学加齢医学研究所 医用細胞資源センターより供与; カタログ番号TKG-0298)を用いた(以下A4細胞と記す。)。この細胞株は10%FBS添加DMEM/F12混合培地(以下アッセイ培地と記す。)により37℃、5%炭酸ガス下でプラスチック培養皿中で培養維持した。

アッセイ培地に懸濁したA4細胞を12ウェルプレートに $3 \times 10^5/\text{well}$ 蒔き込み、
 20 コンフレントになった細胞を薬剤とともに2時間37℃で培養した。細胞をPBSで1回洗浄した後、細胞溶解バッファ(60 mM トリス (pH6.8)、2% SDS、10% グリセロール、5% ベータメルカプトエタノール、0.001% プロモフェノールブルー)に再懸濁し、超音波処理したものを全細胞溶解液としてウェスタンブロット法に用いた。

蛋白量25 μg 分の全細胞溶解液を7.5% SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動にかけ

た後、PVDF膜に転写した。膜をブロッキングした後、0.1% ツイーン20添加トリス緩衝液中で抗ホスホチロシン マウスモノクローナル抗体PY20(Transduction Laboratories、カタログ番号P11120)とインキュベーションし、次にHRP標識抗マウス2次抗体(DAKO、カタログ番号P0447)で処理した。膜を化学発光試薬ECL western blotting detection reagents(Amersham pharmacia biotech、カタログ番号RPN2209)で処理し化学発光をルミノCCDカメラで撮影した。化学発光の撮影と画像解析はMacintosh版デンストグラフ(ATTO、製品型式AE-6930)を用いて行った。

得られたリン酸化シグナルを定量化し、化合物非添加時のシグナルを100%コントロールとし、バックグラウンドシグナルを0%とし、薬剤によるリン酸化阻害を%コントロールで評価した。結果を下記表に示す。

(表2)

細胞Her2チロシンキナーゼ阻害作用		
薬剤	%コントロール (0.1 μ M)	%コントロール (1 μ M)
PD	77	12

実施例1、2の結果より、PDはHer2又はEGFRのいずれに対しても阻害作用を示すこと、即ち、PDがHer2又は/及びEGFR阻害剤として作用することが理解できる。

実施例3

15 in vivo制癌効果

(方法)

ヒト膀胱癌HPAC(ATCC番号CRL-2119)、ヒト大腸癌LS174T(ATCC番号CL-188)そしてヒト肺癌NCI-H520(ATCC番号HTB-182)はATCCより購入した。ヒト子宮頸癌ME180は東北大学加齢医学研究所・医用細胞資源センターより供与いただいた(カタログ番号TKG-0437、ATCCより購入の場合はATCC番号HTB-33)。Balb/c雌ヌードマウス(Balb/cAJcl-nuマウス、日本クレア社、入荷時5週令)の背部皮下にPBSに懸濁した培養ヒト癌細胞を $5 \times 10^6 / 100 \mu$ l移植し、7日前後経過して移植腫瘍の平均体積がほぼ100 mm³となった時点で各群の平均腫瘍体積値が一定になるように1群4匹ずつ群分けを行った。

25 腫瘍体積値はノギスで長径と短径を測定し、 $[(\text{短径})^2 \times (\text{長径} / 2)] = \text{腫瘍}$

体積[mm³]とした。群分けを行った日から14日間連日薬剤を1日1回強制経口投与し、対照群のマウスには薬剤を与えなかった。投与開始日の腫瘍体積値を1とした相対腫瘍増殖率を対照群と薬剤処理群で算出した。制癌効果を%コントロールで示した。%コントロールは下記式により算出した。

- 5 %コントロール = [(薬剤処理群の最終日の平均相対腫瘍増殖率 - 1) / (対照群の最終日の平均相対腫瘍増殖率 - 1)] × 100

結果を下記表に示す。

(表3)

ヒト肺癌HPAC (EGFR, Her2両陽性) に対する制癌効果			
薬剤	投与量 mg/kg	平均相対腫瘍増殖率	%コントロール
対照	—	4.6	100
PD	10	2.4	39
PD	30	1.4	11

(表4)

ヒト子宮頸癌ME180 (EGFR陽性, Her2陰性) に対する制癌効果			
薬剤	投与量 mg/kg	平均相対腫瘍増殖率	%コントロール
対照	—	10.9	100
PD・2HC1	10	3.5	25
PD・2HC1	30	2.7	17

- 10 (表5)

ヒト直腸癌LS174T (EGFR陰性, Her2陽性) に対する制癌効果			
薬剤	投与量 mg/kg	平均相対腫瘍増殖率	%コントロール
対照	—	18.2	100
PD	10	10.7	56
PD	30	6.8	34

(表6)

ヒト肺癌NCI-H520 (EGFR, Her2両陰性) に対する制癌効果			
薬剤	投与量 mg/kg	平均相対腫瘍増殖率	%コントロール
対照	—	8.7	100
PD・2HC1	10	8.3	95
PD・2HC1	30	7.7	87

上記各表に示した結果から、Her2又は／及びEGFR阻害剤は、(EGFR、Her2両陽性)、(EGFR陽性、Her2陰性) 又は (EGFR陰性、Her2陽性) の癌細胞に対して増殖抑制効果を示すこと、即ち、Her2又は／及びEGFR阻害剤はHer2又は／及びEGFRの過剰発現

又は活性化による疾患の予防・治療に有効であることが理解できる。

実施例 4

ウェスタンブロット法によるEGFR又はHer2の発現確認

(方法)

- 5 ヒト肺癌HPAC (ATCC番号CRL-2119)、PANC1 (ATCC番号CRL-1469)、ヒトリンフォーマDaudi (ATCC番号CCL-213)、ヒト大腸癌LS174T (ATCC番号CL-188) はATCCより購入した。ヒト外陰癌A431 (カタログ番号TKG-0182)、ヒト子宮頸癌ME180 (カタログ番号TKG-0437)、ヒト舌癌HSC-3 (カタログ番号TKG-0484)、HSC-4 (カタログ番号TKG-0489) は東北大学加齢医学研究所・医用細胞資源センターより供与いただいた。
- 10 100mm培養皿でほぼコンフルントになるまで細胞培養した。100mm培養皿の培地を除去しPBSで1回洗浄した後に約0.6mLのRIPAバッファ (50mM トリス (pH7.4)、150mM 塩化ナトリウム、1% NP-40、0.25% デオキシコール酸、1mM EDTA、プロテアーゼインヒビターカクテル) を添加し、氷上で10分間静置した。細胞溶解液を1.5mL遠心チューブに回収して10,000rpmで10分間冷却遠心した。上清を別なチューブに移して
- 15 この細胞溶解液をウェスタンブロット法に用いた。
- 蛋白量25 μ g分の細胞溶解液を7.5% SDS-ポリアクリルアミド電気泳動にかけた後PVDF膜に転写した。膜をブロッキングした後、0.1% ツイーン20添加トリス緩衝液中でEGFRに対する特異抗体 (Santa Cruz Biotechnology、カタログ番号sc-03) またはHer2に対する特異抗体 (Upstate biotechnology、カタログ番号06-562) とインキュベ
- 20 ーションし、次にHRP標識抗ウサギ2次抗体 (ICN Pharmaceuticals、カタログ番号55689) で処理した。膜を化学発光試薬ECL western blotting detection reagents (Amersham pharmacia biotech、カタログ番号RPN2209) で処理し化学発光をルミノCCDカメラで撮影した。

図1に画像を示した。また、下記表に図1中の各レーンの説明を示した。

(表 7)

レーン	細胞株	上段図	下段図
		EGFR発現	Her2発現
1	HPAC	陽性	陽性
2	PANC1	陽性	陽性
3	ME180	陽性	陰性
4	Daudi	陰性	陰性
5	A431	陽性	陽性
6	LS174T	陰性	陽性
7	HSC3	陽性	陽性
8	HSC4	陽性	陽性

実施例 5

RT-PCR法によるEGFR又はHer2の発現確認

(方法)

- 5 Molecular Cloning, A Laboratory Manual Vol. 1, Second Editionに従い実験を行なった。以下に詳細に記述する。

癌細胞からS.N.A.P.™ total RNA isolation kit (invitrogen、カタログ番号45-0472) によりtotal RNAを抽出した。得られたtotal RNAのうち1 μ gを用い逆転写反応を行なった。逆転写反応は1st Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR (Roche

- 10 、カタログ番号1 483 188) を用いて行なった。

- このときのプライマーとしてはランダムプライマー p(dN)6を用いた。得られたcDNAの1 μ Lを用いてPCRを行なった。EGFR mRNAの検出時はプライマーはHuman Epidermal growth factor receptor and GAPDH genes Dual-PCR kit (Maxim Biotech、カタログ番号DP-10065-G) 添付のプライマーを用い、酵素はTaKaRa Ex Taq™ (宝酒造、カタログ番号RR001A) を用いた。反応条件は96℃ 1分 1サイクル、96℃ 1分 58℃ 1分 30秒 30サイクル、72℃ 10分 1サイクルで行なった。Her2 mRNAの検出時はプライマーはRT-PCR primer set HUMAN erb-B2 (CLP、カタログ番号5254.H) 添付のプライマーを用い、酵素はTaKaRa Ex Taq™ (宝酒造、カタログ番号RR001A) を用いた。反応条件は94℃ 5分60℃ 5分 1サイクル、72℃ 2分 94℃ 1分 60℃ 1分 40サイ
- 15 クル、72℃10分 1サイクルで行なった。得られたPCR産物についてアガロース電気泳動を行い、発現の有無の確認を行なった。
- 20

上記実施例 4、5 の結果から、ウエスタンブロット法や RT-PCR 法により Her2 又は EGFR の発現確認が可能であることがわかる。

- また、上記実施例 2、4 の結果から、Her2 又は EGFR 活性化の検査が可能であることが分かる。このような検査法を用いて患者における Her2 又は／及び EGFR の発
5 現又は活性を検査し、Her2 又は／及び EGFR が過剰発現又は活性化していると判断された場合には、Her2 又は／及び EGFR の発現又は活性化に起因する疾患を患っていると判定し、本発明の医薬品を投与する。

産業上の利用可能性

- 本発明の阻害剤は、上記のように癌患者に対する有効な治療法であることに加え
10 、前立腺癌や乳癌でのホルモン感受性癌から抵抗性癌への移行を防ぐための予防又は／及び治療薬としても期待できる。更に、固形癌及び肉腫の成長に伴う血管新生、癌転移に伴う血管新生、糖尿病性網膜症に伴う血管新生、動脈硬化、乾癬等の予防又は／及び治療薬としても期待できる。

- 15 本出願は、日本で出願された特願 2002-162130 を基礎としており、それらの内容は、本明細書に全て包含される。

20

25

請求の範囲

1. Her2又は／及びEGFRの発現又は活性を検出するための検査により被検対象のHer2又は／及びEGFRの発現又は活性を診断し、その結果、Her2又は／及びEGFRが過剰発現又は活性化していると判断された被検対象に対して投与するためのHer2又は
5 /及びEGFR阻害剤。
2. Her2又は／及びEGFRの活性を検出するための検査により被検対象のHer2又は／及びEGFRの活性を診断し、その結果、Her2又は／及びEGFRが活性化していると判断された被検対象に対して投与するための請求の範囲 1 に記載の阻害剤。
3. Her2及びEGFRの発現又は活性を検出するための検査により被検対象のHer2及
10 びEGFRの発現又は活性を診断し、その結果、Her2及びEGFRが過剰発現又は活性化していると判断された被検対象に対して投与するための請求の範囲 1 に記載の阻害剤。
。
4. Her2及びEGFRの活性を検出するための検査により被検対象のHer2及びEGFRの活性を診断し、その結果、Her2及びEGFRが活性化していると判断された被検対象
15 に対して投与するための請求の範囲 3 に記載の阻害剤。
5. 被検対象が、Her2又は／及びEGFRの過剰発現又は活性化に起因する疾患を患っていると予想される患者である、請求の範囲 1 から 4 のいずれか 1 項に記載の阻害剤。
6. 被検対象が、Her2及びEGFRの過剰発現又は活性化に起因する疾患を患っていると予想される患者である、請求の範囲 1 から 4 のいずれか 1 項に記載の阻害剤。
20 。
7. 被検対象がヒトである、請求の範囲 1 から 6 のいずれか 1 項に記載の阻害剤。
。
8. Her2又は／及びEGFRの発現又は活性を検出するための検査が体外検査である請求の範囲 1 から 4 のいずれか 1 項に記載の阻害剤。
- 25 9. Her2及びEGFRの発現又は活性を検出するための検査が体外検査である請求の範囲 1 から 4 のいずれか 1 項に記載の阻害剤。
10. Her2阻害剤及びEGFR阻害剤からなる合剤である請求の範囲 3 に記載の阻害

剤。

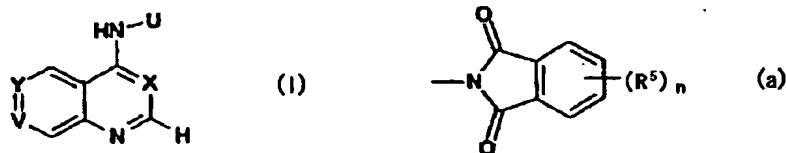
1 1. Her2阻害剤及びEGFR阻害剤を同時に、別々に、又は経時的に間隔を置いて投与するための請求の範囲 1 から 9 のいずれか 1 項に記載の阻害剤。

1 2. 体外検査が、抗体を用いた免疫学的方法又は核酸及び核酸誘導体を用いた
5 ハイブリダイゼーション法である請求の範囲 8 又は 9 に記載の阻害剤。

1 3. 抗体を用いた免疫学的方法が、固相酵素免疫検定法、酵素-結合免疫アッセイ法、ラジオイムノアッセイ法、免疫組織化学的方法、及びウエスタンブロット法からなる群より選ばれる方法である請求の範囲 1 2 に記載の阻害剤。

1 4. 核酸及び核酸誘導体を用いたハイブリダイゼーション法が、RT-PCR
10 法、ISH法、FISH法、ノーザンブロット法、及びサザンブロット法からなる群より選ばれる方法である請求の範囲 1 2 に記載の阻害剤。

1 5. 下記一般式 (I)



(式中、XはN又はCHであり；YがCR¹であって、VがNであるか；又はYが
15 Nであって、VがCR¹であるか；又はYがCR¹であって、VがCR²であるか；
又はYがCR²であって、VがCR¹であり；R¹はC₁₋₄アルキル、C₁₋₄アルコキシ、
CH₃SO₂CH₂CH₂NHCH₂-Ar-（ここで、Arはフェニル、フラン、チオフェン、
ピロール及びチアゾールから選択され、その各々は所望により1も
しくは2個のハロゲン、C₁₋₄アルキル又はC₁₋₄アルコキシで置換されていても
20 よい。）又は-C≡C-C(R⁶)(R⁷)(R⁸)（ここで、R⁶、R⁷、R⁸はそれぞれ独立して、
水素原子、ヒドロキシ、ハロゲン、C₁₋₄アルキル又はC₁₋₄アルコキシ、又は、
環が水素原子又はC₁₋₄アルキルで置換されていてもよく、環内にO

- 、S又はNから選ばれる1から2個のヘテロ原子を含んでいてもよい C_{3-6} のシクロアルキルを表す。)を表し; R^2 は水素、ハロゲン、ヒドロキシ、 C_{1-4} アルキル、 C_{1-4} アルコキシ、 C_{1-4} アルキルアミノ、ジ[C_{1-4} アルキル]アミノ及び-NHCO- R^9 (ここで、 R^9 は C_{1-4} アルキル、 C_{1-4} アルコキシ、 C_{2-4} アルケニル又は C_{2-4} アルキニルを示す。)からなる群から選択され;Uは R^3 基で置換され、かつさらに所望により独立に選択される少なくとも1個の R^4 基で置換されていてもよいフェニル、ピリジル、3H-イミダゾリル、インドリル、イソインドリル、インドリニル、イソインドリニル、1H-インダゾリル、2,3-ジヒドロ-1H-インダゾリル、1H-ベンズイミダゾリル、2,3-ジヒドロ-1H-ベンズイミダゾリル又は1H-ベンゾトリアゾリル基を表し; R^3 はベンジル、ハロー、ジハロー及びトリハロベンジル、ベンゾイル、ピリジルメチル、ピリジルメトキシ、フェノキシ、ベンジルオキシ、ハロー、ジハロー及びトリハロベンジルオキシならびにベンゼンスルホニルからなる群から選択されるか;又は R^3 はトリハロメチルベンジル又はトリハロメチルベンジルオキシを表すか;又は R^3 は上記式(a)の基を表し(式中、 R^5 は各々独立にハロゲン、 C_{1-4} アルキル及び C_{1-4} アルコキシから選択され;かつ、nは0~3である); R^4 は各々独立にヒドロキシ、ハロゲン、 C_{1-4} アルキル、 C_{2-4} アルケニル、 C_{2-4} アルキニル、 C_{1-4} アルコキシ、アミノ、 C_{1-4} アルキルアミノ、ジ[C_{1-4} アルキル]アミノ、 C_{1-4} アルキルチオ、 C_{1-4} アルキルスルフィニル、 C_{1-4} アルキルスルホニル、 C_{1-4} アルキルカルボニル、カルボキシ、カルバモイル、 C_{1-4} アルコキシカルボニル、 C_{1-4} アルカノイルアミノ、N-(C_{1-4} アルキル)カルバモイル、N,N-ジ(C_{1-4} アルキル)カルバモイル、シアノ、ニトロ及びトリフルオロメチルである。)で示される置換ヘテロ芳香族化合物、もしくはその薬学的に許容される塩、それらの水和物もしくは溶媒和物、それらの光学活性体もしくはラセミ体、又は、それらのジアステレオマー混合物である請求の範囲1から14のいずれか1項に記載の阻害剤。

16. (4-(3-フルオロベンジルオキシ)-フェニル)-(6-(5-(2-メタンスルホニル-エチルアミノ)メチル)-フラン-2-イル)-ピリド[

- 3, 4-d] ピリミジン-4-イル) -アミン;
 (4-ベンジルオキシフェニル) - (6- (5- ((2-メタンスルホニル-エチル
 アミノ) -メチル) -フラン-2-イル) -キナゾリン-4-イル) -アミン;
 N- {4- [(3-フルオロベンジル) オキシ] フェニル} -6- [5- ({2- (メチル
 5 スルホニル) エチル] アミノ} メチル) -2-フリル] -4-キナゾリンア
 ミン;
 N- [4- (ベンジルオキシ) フェニル] -7-メトキシ-6- [5- ({2- (メチル
 スルホニル) エチル] アミノ} メチル) -2-フリル] -4-キナゾリンア
 ミン;
 10 N- (1-ベンジル-1H-インダゾール-5-イル) -7-メトキシ-6- [5-
 - ({2- (メチルスルホニル) エチル] アミノ} メチル) -2-フリル] -4-
 キナゾリンアミン;
 N- {3-フルオロ-4- [(3-フルオロベンジル) オキシ] フェニル} -6- [5-
 5 - ({2- (メチルスルホニル) エチル] アミノ} メチル) -2-フリル] -4-
 15 -キナゾリンアミン;
 N- [1- (3-フルオロベンジル) -1H-インダゾール-5-イル] -6- [2-
 2- ({2- (メチルスルホニル) エチル] アミノ} メチル) -1, 3-チアゾ
 ル-4-イル] -4-キナゾリンアミン;
 6- [5- ({2- (メチルスルホニル) エチル] アミノ} メチル) -2-フリル
 20] -N- [4- (フェニルスルホニル) フェニル] -4-キナゾリンアミン;
 N- {3-フルオロ-4- [(3-フルオロベンジル) オキシ] フェニル} -6- [2-
 2- ({2- (メチルスルホニル) エチル] アミノ} メチル) -1, 3-チアゾ
 ル-4-イル] -4-キナゾリンアミン;
 N- (1-ベンジル-1H-インダゾール-5-イル) -6- [2- ({2- (メ
 25 チルスルホニル) エチル] アミノ} メチル) -1, 3-チアゾール-4-イル] -
 4-キナゾリンアミン;
 N- (3-フルオロ-4-ベンジルオキシフェニル) -6- [5- ({2- (メチ

- ルスルホニル) エチル] アミノ} メチル) - 4 - フリル] - 4 - キナゾリンアミン ;
- N - (3 - クロロ - 4 - ベンジルオキシフェニル) - 6 - [2 - ({[2 - (メチルスルホニル) エチル] アミノ} メチル) - 4 - フリル] - 4 - キナゾリンアミン ;
- 5 N - {3 - クロロ - 4 - [(3 - フルオロベンジル) オキシ] フェニル} - 6 - [5 - ({[2 - (メチルスルホニル) エチル] アミノ} メチル) - 2 - フリル] - 4 - キナゾリンアミン ;
- N - (1 - ベンジル - 1 H - インダゾール - 5 - イル) - 7 - フルオロ - 6 - [5 - ({[2 - (メチルスルホニル) エチル] アミノ} メチル) - 2 - フリル] - 4 -
- 10 キナゾリンアミン ;
- N - (3 - トリフルオロメチル - 4 - ベンジルオキシフェニル) - 6 - [5 - ({[2 - (メチルスルホニル) エチル] アミノ} メチル) - 4 - フリル] - 4 - キナゾリンアミン ;
- N - [4 - (3 - クロロ - 4 - フルオロフェニル) アミノ - 7 - [3 - (4 - モル
- 15 ホリニル) プロポキシ] キナゾリン - 6 - イル] アクリルアミド ;
- N - {4 - [(3 - クロロ - 4 - フルオロフェニル) アミノ] - 7 - [3 - メチル - 3 - (4 - メチル - 1 - ピペラジニル) - 1 - ブチニル] - 6 - キナゾリニル} アクリルアミド ; 又は
- N - {3 - クロロ - 4 - [(3 - フルオロベンジル) オキシ] フェニル} - 6 - [5 -
- 20 ({[2 - (メタンスルホニル) エチル] アミノ} メチル) - 2 - フリル] - 4 - キナゾリンアミンもしくはその薬学的に許容される塩、それらの水和物もしくは溶媒和物、それらの光学活性体もしくはラセミ体、又は、それらのジアステレオマー混合物である請求の範囲 1 から 15 のいずれか 1 項に記載の阻害剤。
17. N - [4 - (3 - クロロ - 4 - フルオロフェニル) アミノ] - 7 - [3 -
- 25 (4 - モルホリニル) プロポキシ] キナゾリン - 6 - イル] アクリルアミド、又は
- N - {3 - クロロ - 4 - [(3 - フルオロベンジル) オキシ] フェニル} - 6 - [5 - ({[2 - (メタンスルホニル) エチル] アミノ} メチル) - 2 - フリル] - 4 - キ

ナゾリンアミンもしくはその薬学的に許容される塩、それらの水和物もしくは溶媒和物、それらの光学活性体もしくはラセミ体又はそれらのジアステレオマー混合物である請求の範囲 1 から 16 のいずれか 1 項に記載の阻害剤。

18. 請求の範囲 1 から 17 のいずれか 1 項に記載の阻害剤を有効成分として含有し、かつ製薬上許容され得る担体を含有する医薬組成物。

19. Her2又は／及びEGFRの過剰発現又は活性化に起因する疾患の予防又は／及び治療薬である請求の範囲 18 に記載の医薬組成物。

20. Her2又は／及びEGFRの過剰発現又は活性化に起因する疾患が癌、癌及び肉腫の成長に伴う血管新生、癌転移に伴う血管新生、糖尿病性網膜症に伴う血管新生、動脈硬化、又は乾癬である請求の範囲 19 に記載の医薬組成物。

21. Her2又は／及びEGFRの発現又は活性を検出するための検査により被検対象のHer2又は／及びEGFRの発現又は活性を診断し、その結果、Her2又は／及びEGFRが過剰発現又は活性化していると判断された被検対象に対して投与するための、Her2又は／及びEGFRの過剰発現又は活性化に起因する疾患の予防又は／及び治療薬。

22. Her2又は／及びEGFRの過剰発現又は活性化に起因する疾患が癌、癌及び肉腫の成長に伴う血管新生、癌転移に伴う血管新生、糖尿病性網膜症に伴う血管新生、動脈硬化、又は乾癬である請求の範囲 21 に記載の予防又は／及び治療薬。

23. Her2又は／及びEGFRの発現又は活性を検出するための検査により被検対象のHer2又は／及びEGFRの発現又は活性を診断し、その結果、Her2又は／及びEGFRが過剰発現又は活性化していると判断された被検対象に対して有効量のHer2又は／及びEGFR阻害剤を投与することを特徴とする、Her2又は／及びEGFRの過剰発現又は活性化に起因する疾患の予防又は／及び治療方法。

24. Her2又は／及びEGFRの過剰発現又は活性化に起因する疾患が癌、癌及び肉腫の成長に伴う血管新生、癌転移に伴う血管新生、糖尿病性網膜症に伴う血管新生、動脈硬化、又は乾癬である請求の範囲 23 に記載の予防又は／及び治療方法。

25. 請求の範囲 18 から 20 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物、及び該医薬組成物をHer2又は／及びEGFRの過剰発現又は活性化に起因する疾患の予防又は／及び

治療に使用し得るか又は使用すべきであることを記載した書類とを含む商業的パッケージ。

26. Her2又は/及びEGFRの過剰発現又は活性化に起因する疾患が癌、癌及び肉腫の成長に伴う血管新生、癌転移に伴う血管新生、糖尿病性網膜症に伴う血管新生、

5 動脈硬化、又は乾癬である請求の範囲25に記載の商業的パッケージ。

10

15

20

25

WO 03/101491

PCT/JP03/06988

図 1

1 2 3 4 5 6 7 8



上段

下段